

# 初期胚脱メチル化機構が体細胞クローンマウス胚の

## 発生および分化に及ぼす影響

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 家畜改良増殖学 小山 詩織

### 1. はじめに

体細胞クローン個体の作出率はわずか数%であり、原因の一つに遺伝子発現調節を担うエピジェネティック修飾 DNA メチル化の異常が考えられている。体細胞クローン胚では通常胚に比べメチル化レベルが高いという異常が報告されており、これが様々な遺伝子発現異常を引き起こすと考えられている。しかし、今のところ人為的に特定領域の DNA メチル化レベルを制御する科学技術が無いため、根本的な改善策は無い。本研究室では、胚が本来持っている脱メチル化機構に着目した連続核移植法 (serNT) を行い、クローン胚の高メチル化状態を低減することに成功しているが、作出効率が低く、得られた胚の正常性は未確認であった。そこで本研究では、serNT の作出効率向上を図るとともに、個体発生において最初の分化がみられる胚盤胞期において分化マーカータンパク質の局在パターンについて調べた。

### 2. 方法

卵丘細胞をドナーとする一段階目の核移植 (sinNT) によって作出した再構築胚を体外培養し、更に、得られた 2 細胞期胚の割球をドナーとして再び二段階目の serNT に供し、卵割率と胚盤胞期への発生率を調べた。serNT 胚作製において、チューブリン重合阻害剤であるノコダゾールによる細胞周期処理時間の最適化、および、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA 処理を試し、従来法の発生率と比較した。また、体外受精 (IVF)、sinNT、および serNT 由来の胚盤胞期胚において、Oct4 および Tead4 タンパク質の局在を免疫染色によって調べた。

### 3. 結果と考察

ノコダゾール処理時間を従来の 3 時間から 12 時間に変更したところ、予想通り M 期の割球数の割合が高くなった (57.1% vs 75.0%)。加えて TSA 処理を施した場合、serNT 胚の卵割率、胚盤胞期胚への発生率が従来法に比較して有意に向上した (卵割率: 50.0% vs 80.6%; 胚盤胞期胚率: 0% vs 31.3%) ( $p < 0.05$ )。また、免疫染色の結果から Tead4 では sinNT 胚および serNT 胚ともに IVF 胚と比べて顕著な差はみられなかった。一方、正常な受精卵では胚盤胞期胚において内部細胞塊に局在する Oct4 に関しては、過去の報告と一致して sinNT 胚で異所性の発現異常がみられたが、serNT 胚では IVF 胚と同様の局在パターンが観察された。胚盤胞期胚への作出効率は向上したものの、胎子および個体までの発生への影響を今後調べる必要がある。また serNT 胚でメチル化レベルが低下したことにより、Oct4 の発現調節に影響を与え、胚盤胞期胚での局在が正常化したのかもしれない。

### 4. 結論

serNT により正常な分化能を有した体細胞クローン胚を作出できる可能性が示された。